

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659515

研究課題名（和文）表皮水疱症に対する骨髄移植による欠損タンパク発現療法の作用機序解明

研究課題名（英文）Mechanism of allogenic bone marrow therapy in epidermolysis bullosa model mice

研究代表者

阿部 理一郎 (ABE RIICHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60344511

研究成果の概要（和文）：

表皮水疱症は先天的に皮膚構造蛋白に異常を有することで、皮膚の脆弱性をきたす難治性皮膚疾患である。本研究の目的は、もっとも頻度の高い表皮水疱症である、栄養障害型表皮水疱症に対する根本的治療法として、骨髄由来細胞および幹細胞移植療法の臨床治療の有用性を検討するものである。本研究において骨髄移植の施行および transdifferentiated cell の検討し、骨髄由来表皮細胞の存在を確認した。電子顕微鏡での微細構造においても anchoring fibril の発現および臨床的改善を認めた。しかし分化細胞の同定および分化因子の推定:皮膚構成細胞および COL7 産生細胞へ分化したドナー由来責任細胞を同定までにはいたらなかった。

研究成果の概要（英文）：

Attempts to treat congenital protein deficiencies using bone marrow-derived cells have been reported according to the concepts of stem cell plasticity. However, it is considered more difficult to restore structural proteins than to restore secretory enzymes. The aim of the study is to clarify whether bone marrow transplantation (BMT) treatment can rescue epidermolysis bullosa (EB) caused by the defect of keratinocyte structural proteins. BMT treatment of adult collagen XVII (Col17) knockout mice induced donor-derived keratinocytes, Col17 expression associated with the recovery of hemidesmosomal structure and better skin manifestations, as well improving the survival rate. Both hematopoietic and mesenchymal stem cells have the potential to produce Col17 in the BMT treatment model. The current conventional BMT techniques have significant potential as a systemic therapeutic approach for the treatment of human EB.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚炎症・再生学

1. 研究開始当初の背景

表皮水疱症は先天的に皮膚構造蛋白に異常を有することで、皮膚の脆弱性をきたす難治性皮膚疾患である。現時点で根本的かつ有効な治療法は確立されていない。本研究の目的は、もっとも頻度の高い表皮水疱症である、栄養障害型表皮水疱症に対する根本的治療法として、骨髄由来細胞および幹細胞移植療法の臨床治療の有用性を、ヒト化蛋白モデルマウスを用いて検討するものである。また本研究の基礎的な部分は平成 23 年度科学研究費補助金挑戦的萌芽研究（研究代表者：清水宏）に採択されている。

2. 研究の目的

本研究はこれまでの検討をさらに発展させたものとして、骨髄および末梢血中に含まれる幹細胞の‘分化’transdifferentiationを解析することで、有効な治療法の確立していない先天性難治皮膚疾患に対する治療法の確立に寄与する。

3. 研究の方法

(1) 骨髄移植の施行および

transdifferentiated cell の検討

ドナーとなる hCOL7-RDEB マウスの繁殖を行った上で、骨髄移植を施行する。

hCOL7-RDEB マウスは繁殖および維持が非常に困難であるため、同時に COL7 完全ヒト化マウスもドナーとして使用し、検討する。レシピエントとしては正常の C57BL/L マウスの他、ドナー由来細胞を同定するために GFP+Tg マウスを用いる。transdifferentiation ない

し cell fusion による皮膚構成細胞への出現を FISH 解析で検討するため、ドナーとレシピエント間での性別を異なるようにする。移植後生着をフローサイトメトリー解析で確認した後、正常部皮膚およびびらん上皮化部皮膚を採取し、RT-PCR, quantitative RT-PCR, 免疫染色および Western blotting によって COL7 の発現を検討する。ドナー由来細胞の存在および頻度を検討するために免疫染色で GFP 陽性皮膚構成細胞を解析する。また、皮膚構成細胞を単離し、フローサイトメトリー解析・分離によってドナー由来細胞の profile を細胞培養・RT-PCR にて解析する。

(2) 移植後の臨床症状評価

実際の皮膚の強度への関与を評価するため、電子顕微鏡での微細構造の変化および臨床的な変化を観察する。長期予後解析のため、移植後最低 1 年間是有棘細胞癌の発生の有無を観察し、死亡率を Kaplan-Meier 解析および Logrank 検定にて検討する。

(3) 分化細胞の同定および分化因子の推定

これらの実験により予想される結果が得られた場合、さらに皮膚構成細胞および COL7 産生細胞へ分化したドナー由来責任細胞を同定するため、フローサイトメトリーおよび細胞培養にて得られた単離幹細胞（造血系幹細胞・間葉系間質細胞など）を移植し、上記と同様の手技を用いて解析する。また、分化

細胞で発現しているケモカイン等を解析し、分化因子と推定されたものを移植時や移植後に投与し、皮膚分化細胞数の変化などを検討する。

4. 研究成果：

表皮水疱症は先天的に皮膚構造蛋白に異常を有することで、皮膚の脆弱性をきたす難治性皮膚疾患である。現時点で根本的かつ有効な治療法は確立されていない。本研究の目的は、もっとも頻度の高い表皮水疱症である、栄養障害型表皮水疱症に対する根本的治療法として、骨髄由来細胞および幹細胞移植療法の臨床治療の有用性を、ヒト化蛋白モデルマウスを用いて検討するものである。骨髄および末梢血中に含まれる幹細胞の transdifferentiation を解析することで、有効な治療法の確立していない先天性難治皮膚疾患に対する治療法の確立に寄与する。本研究課題について以下について検討を行い、成果を得た。

(1) 骨髄移植の施行および transdifferentiated cell の検討

骨髄移植後、正常部皮膚およびびらん上皮化部皮膚を採取し、COL7 の発現を検討した。ドナー由来細胞の存在および頻度を検討するために免疫染色で GFP 陽性皮膚構成細胞を解析した。結果、骨髄由来の表皮細胞の存在を確認した。頻度は、前基底細胞中 1～数%であった。加えて、

表皮真皮境界部に COL7 の発現も認めた。発現度合いは、前基底膜の 15%程度であった。

(2) 移植後の臨床症状評価

実際の皮膚の強度への関与を評価するため、電子顕微鏡での微細構造の変化および臨床的な変化を観察した。長期予後解析のため、移植後最低 1 年間は有棘細胞癌の発生の有無を観察し、死亡率を検討した。超微細構造上、ヘミデスモゾームの数および形態的な改善が認められた。さらに粘膜部の潰瘍形成も著明な減少がみられた。また観察期間中、有棘細胞癌の発生は認められなかった。

(3) 分化細胞の同定および分化因子の推定

皮膚構成細胞および COL7 産生細胞へ分化したドナー由来責任細胞を同定までにはいたらなかった。引き続き検討を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Fujita Y, Abe R, et al. Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte

secretory factors, Clin Exp Dermatol,
査読有、37 卷、2012、658-664
DOI : 10.1111/j.1365-2230.2011.04312.x.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 理一郎 (ABE RIICHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 6 0 3 4 4 5 1 1